



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 198 08 591 A 1

21 Aktenzeichen: 198 08 591.5
22 Anmeldetag: 28. 2. 98
43 Offenlegungstag: 16. 9. 99

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/533
G 01 N 33/577
G 01 N 33/15
G 01 N 21/64
// G 01 N 21/49

DE 198 08 591 A 1

71 Anmelder:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

72 Erfinder:
Kochsch, Mario, Dr.med., 04315 Leipzig, DE; Woinke,
Michael, 04299 Leipzig, DE

56 Entgegenhaltungen:
Datenbank: Medline auf STN. AN 94135699, AB.;
SATO, T. (u.a.), in: Thrombosis Research, 1993,
Bd.72, Nr.5, S.389-400;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Standardisierter durchflußzytometrischer Vollblutassay

57 Für die Überwachung und Optimierung der Behandlung mit Fibrinogenrezeptorantagonisten, einer neuen Klasse von antithrombotischen Medikamenten, wird ein selektiver und quantitativer Test zur Bestimmung der therapeutischen Blockade der Fibrinogenrezeptoren auf Thrombozyten benötigt.

Der beschriebene durchflußzytometrische Assay ermöglicht durch das Prinzip der Kompetition eines fluorogenen Substrates mit dem therapeutisch verwendeten Fibrinogenrezeptorblocker um die Bindung am Rezeptor eine Quantifizierung des medikamentösen Effektes auf die Thrombozyten. Die Analyse unstimulierter und maximal stimulierter Thrombozyten erlaubt die Beurteilung der Medikamentenwirkung über die gesamte Breite der aktivierungsabhängig hochregulierten Expressionsdichte der Fibrinogenrezeptoren. Zur Überwachung der Geräteeinstellung und -leistung sowie Kalibrierung der Fluoreszenzintensitäten in absolute Anzahlen gebundener fluoreszenzmarkierter Substrate werden Beads eingesetzt.

DE 198 08 591 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen standardisierten durchflußzytometrischen Vollblutassay zur Quantifizierung der Fibrinogenrezeptorblockade durch Fibrinogenrezeptorantagonisten.

Der Assay findet Anwendung in klinischen Disziplinen, die sich mit dem Therapiemonitoring bei der Behandlung von Patienten mit Fibrinogenrezeptorantagonisten (z. B. Kardiologie, Angiologie, Neurologie) befassen, und in nichtklinischen Disziplinen, die die Entwicklung und Erprobung neuer Substanzen dieser Präparateklasse in vitro und im Tiermodell zum Ziel haben.

Der Fibrinogenrezeptor (Glykoproteinkomplex IIb/IIIa) wird ausschließlich auf Blutplättchen (Thrombozyten) exprimiert und vermittelt über Bindung von Fibrinogen am aktivierten Rezeptorkomplex die Aggregation von Thrombozyten nach Aktivierung durch physiologische Stimuli. Damit kommt der Wechselwirkung von Fibrinogen und seinem Rezeptor auf Thrombozyten eine entscheidende Bedeutung zu – unter physiologischen Bedingungen bei der Bildung von Thrombozytenaggregaten zum Verschluß von Gefäßverletzungen und bei der Erhaltung der Gefäßintegrität.

Unter pathologischen Bedingungen (wie z. B. degenerative arteriosklerotische Gefäßerkrankungen, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen u. a.) führt die gesteigerte Thrombozytenaktivierung zu einer verstärkten Bildung von plättchenreichen Aggregaten und damit zum thrombotischen Verschluß von Gefäßen.

Aus diesem Grund entsteht mit der Entwicklung von Inhibitoren der Fibrinogenbindung am Fibrinogenrezeptor eine neue und sehr interessante Klasse von antithrombozytären Medikamenten. Bereits im klinischen Einsatz ist ein blockierender Antikörper (murin-human chimärer Klon c7E3 Fab; abciximab; ReoPro®), der entsprechend der Ergebnisse aus der Phase III-Studie EPIC (1) als zusätzliche Medikation neben Heparin und Acetylsalicylsäure (ASS) bei Patienten mit akutem Herzinfarkt und instabiler Angina pectoris in verschiedenen Ländern zugelassen ist. Auf den Ergebnissen der drei Studienarme beruht die z.Zt. empfohlene Anwendung des Medikamentes mit Bolus und anschließender zwölfstündiger Infusion. Weitere peptidische und nichtpeptidische Fibrinogenrezeptorantagonisten (Eptifibatide [2], Lamifiban [3]) sind in verschiedenen Phasen ihrer klinischen Erprobung für die intravenöse und orale Anwendung.

Der Einsatz der Fibrinogenrezeptorantagonisten erfolgt in Kombination mit anderen antithrombotischen Medikamenten wie ASS und Heparin. Daher stellt das selektive und quantitative Monitoring jedes Medikamentes allein und in der Kombination eine entscheidende Voraussetzung zur Beurteilung der Effektivität und für die Entwicklung von individuellen Dosierungsempfehlungen dar. Eine funktionell wirksame Inhibierung der Thrombozytenaggregation tritt erst bei einer Blockade von mehr als 75% der Fibrinogenrezeptoren auf und erreicht ihr Maximum bei ca. 85% Blockade (4). Für die individuelle Dosisanpassung bei der akuten intravenösen Gabe und auch bei der chronischen Anwendung oraler Substanzen ist daher die Quantifizierung im Bereich unterhalb der Blockade von 75% der Rezeptoren von entscheidender Bedeutung.

Für das Monitoring der Fibrinogenrezeptorantagonisten wurden bisher folgende Methoden publiziert: a) Blutungszeit (5), b) Aggregometrie (6), c) Thrombelastografie (7), d) Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100) (8), e) plättchen-induzierte Thrombingenerierungszeit (9), f) Konkurrenz mit radioaktiv-markierten Antikörpern (10) und Antikörperfragmenten (11), g) induzierte Aggregation fibrinogenbeschichteter Plastekügelchen (4) und h) durchflußzytometri-

sche Wettbewerbsassays mit dem fluoreszenzmarkierten Medikament (12) bzw. i) einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (13) oder fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen (14).

Die Nachteile der bisher publizierten Methoden liegen in der mangelnden Selektivität für den Nachweis der Wirkung der Fibrinogenrezeptorantagonisten bei der Kombinationstherapie mehrerer antithrombotischer Medikamente (a, b, c, d, e), in der ungenügenden Quantifizierbarkeit der Rezeptorblockade (a, b, c, d, e, g), in der Verwendung hochspezialisierter Geräte und Instrumente (c, d, e, f), in der Anwendung radioaktiver Substanzen (f) und in der fehlenden Verfügbarkeit fluoreszenzmarkierter Derivate der therapeutisch zugelassenen Fibrinogenrezeptorblocker (h) sowie in der ungenügenden Standardisierung, Gerätekalibrierung, Qualitätskontrolle und Beachtung der aktivierungsabhängig steigenden Rezeptorexpressionsdichte (h, i).

Die Ursachen der Nachteile liegen in folgendem.

Die Methoden a)–e) (Blutungszeit, Aggregometrie, Thrombelastografie, PFA-100-Messung und plättchen-induzierte Thrombingenerierung) können eine angeborene oder erworbene Unterfunktion der Thrombozyten (z. B. infolge antithrombotischer Therapie) nachweisen, ermöglichen aber methodisch bedingt nicht die selektive Bestimmung der jeweiligen Einzelwirkung bei einer antithrombotischen Kombinationstherapie. Der Einsatz der Fibrinogenrezeptorantagonisten erfolgt entsprechend dem aktuellen Wissenstand aber in Kombination mit ASS und Heparin.

Darüberhinaus ist keine exakte Quantifizierung der Rezeptorblockade durch Fibrinogenrezeptorantagonisten mit den Methoden a)–e) und g) möglich, da eine niedrige Rezeptorbesetzung bis ca. 75% funktionell noch nicht bedeutsam ist und damit nicht erfaßt werden kann. Für die individuelle Dosisanpassung ist aber gerade die Quantifizierung dieses subtherapeutischen Bereiches wichtig.

Eine Reihe von Methoden erfordert technische Geräte und Labormöglichkeiten, die hochspezialisiert, nur für wenige Fragestellungen einsetzbar sind und daher nur für wenige Labors in Frage kommen. Thrombelastografie (c) und PFA-100-Gerät (d) wurden als Screeningmethoden für die Thrombozytenfunktion entwickelt und sind ausschließlich für diese Fragestellung einsetzbar. Die Anwendung von radioaktiv markierten Antikörpern (f) erfordert bau- und gerätetechnische sowie strahlenschutzrechtliche Voraussetzungen, die bei neuen Routineassays heute vermieden werden sollten.

Der vorgestellte durchflußzytometrische Assay mit einem fluoreszenten Derivat des Medikamentes als Kompetitor (h) ist hochselektiv für den getesteten Fibrinogenrezeptorantagonisten. Insbesondere für nichtpeptidische Fibrinogenrezeptorantagonisten ist aber dieses Testprinzip in vielen Fällen synthetisch nicht leicht zu lösen, da die Kopplung des Fluorophors am meist sehr kleinen Inhibitor zu keiner Beeinflussung seiner Bindungseigenschaften führen darf.

In dem als Abstract publizierten Assay von I. Besson und M.C. McGregor (i) wird die Konkurrenz von Fibrinogenrezeptorantagonisten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorgestellt. Hierin fehlen aber die für einen allgemein einsetzbaren Routinetest notwendige Standardisierung, Gerätekalibrierung und Minimierung der unspezifischen Bindung. Darüberhinaus konnte die Arbeitsgruppe von B.S. Collier (11) nachweisen, daß der Einsatz von intakten IgG-Antikörpern aufgrund der zwei Bindungsvalenzen im Gegensatz zum monovalenten Fab-Fragment nur 50% der tatsächlich vorhandenen Antigene detektiert. In keinem der publizierten Tests wird die aktivierungsabhängig steigende Expressionsdichte des GpIIb/IIIa-Rezeptors berücksichtigt.

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung eines standardisierten, selektiven und quantitativen Assays zur

Bestimmung der Rezeptorblockade durch Fibrinogenrezeptorantagonisten auf unstimulierten und stimulierten Thrombozyten.

Ein durchflußzytometrischer Assay auf dem Prinzip der Konkurrenz eines fluoreszenten Substrates mit einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor ermöglicht die quantitative und selektive Analyse der Fibrinogenrezeptorblockade und wird in Verbindung mit der Minimierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, der Stimulation *in vitro* mit einem starken Agonisten, mit der Kalibrierung und Standardisierung der Gerätefluoreszenz sowie der Option zur Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzsignale in die Anzahl besetzter Fibrinogenrezeptoren zu einem standardisierten Routinetest.

Die Erfindung wird nachfolgend im einzelnen dargestellt.

Prinzip

Das Prinzip des Assays besteht in der Konkurrenz therapeutisch eingesetzter Fibrinogenrezeptorantagonisten (z. B. monoklonale Antikörper wie c7E3 [Reo-Pro®], lineare oder zyklische RGD-Peptide wie Eptifibatide [Integrilin®] oder nicht-peptidische Fibrinogenrezeptorantagonisten wie Lamifiban) mit einem fluoreszenzmarkierten Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (z. B. Fab der Klonen P2, LYP18 oder c7E3), einem fluoreszenzmarkierten linearen oder zyklischen RGD-Peptid oder einem nicht-peptidischen Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor der Thrombozyten.

Ansatz

Vor Beginn der Therapie mit dem Fibrinogenrezeptorantagonisten wird eine schönde Blutentnahme beim Patienten (geringe venöse Stauung, kurze und weitlumige Kanüle) durchgeführt. Das Vollblut wird durch Verdünnen in Pufferlösung (z. B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung [PBS] oder Hank's Balanced Salt Solution [HBSS]; pH 7,4), die humanes Immunglobulin [1 mg/ml] zur Verminderung der unspezifischen Antikörperbindung enthält, auf eine Zahl von 10.000 Thrombozyten/µl eingestellt.

Eine definierte Zahl von Thrombozyten wird unstimuliert mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates inkubiert und so der maximale Fluoreszenzwert der unstimulierten Probe ermittelt (entspricht 0% Rezeptorblockade). Im Parallelansatz wird die gleiche Absolutzahl von Thrombozyten mit einem starken, proteasereisistenten Agonisten maximal stimuliert (z. B. TRAP-6 mit N-terminaler Substitution von Serin durch Isoerin) (15). Der Fluoreszenzwert nach anschließender Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Substrat in sättigender Konzentration entspricht 0% Rezeptorblockade bei maximal stimulierten Thrombozyten. In einem dritten Ansatz erfolgt wiederum bei gleicher Absolutzahl der Thrombozyten die *in vitro*-Blockierung aller blockierbaren GpIIb/IIIa-Rezeptoren mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten. Die Endkonzentration wird im Ansatz so gewählt, daß sie dem Doppelten der Medikamentenkonzentration im Vollblut entspricht, die nach Bolusgabe der maximal zur Therapie zugelassenen Medikamentendosis erreicht werden kann.

Die Identifizierung der Thrombozyten folgt in allen drei Ansätzen dem gleichen Prinzip. Verwendet wird ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper in sättigender Konzentration, der eine räumlich weit von der Fibrinogenbindungsstelle entfernte Struktur des Fibrinogenrezeptors erkennt und mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff als das

Substrat konjugiert ist. Es sollten zwei Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt werden, deren Emissionsbereiche sich nicht wesentlich überlappen (z. B. Fluoresceinisothiocyanat [FITC] mit Phycoerythrin-Cyan5 [PE-Cy5] oder Phycoerythrin [PE] mit PE-Cy5, so daß keine Kompensationsprobleme auftreten. Für die Markierung des Substrates erscheint FITC besonders geeignet, da aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes die Gefahr einer sterischen Behinderung am GpIIb/IIIa-Rezeptor gering ist.

Unter laufender Therapie mit einem Fibrinogenrezeptorantagonisten kann nun nach Inkubation der unstimulierten bzw. stimulierten Patiententhrombozyten mit dem fluoreszenzmarkierten Substrat aus der gemessenen Fluoreszenzintensität auf den jeweiligen Prozentsatz therapeutisch blockierter bzw. bei maximal stimulierten Thrombozyten blockierbarer Fibrinogenrezeptoren geschlossen werden.

Kalibrierung der Fluoreszenzsignale in die Anzahl geblockter Fibrinogenrezeptoren durch den therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten

Die gemessenen arbiträren Fluoreszenzintensitäten können nicht direkt zur Berechnung der Zahl geblockter Rezeptoren verwendet werden. Die Absolutwerte der Fluoreszenzintensitäten sind vom Durchflußzytometer, der Verstärkereinstellung des Gerätes und vom fluoreszenten Substrat abhängig. Erst die Kalibrierung der gemessenen Fluoreszenzsignale in die Anzahl blockierter Fibrinogenrezeptoren erlaubt nicht nur einen Vergleich der prozentualen Rezeptorbesetzung, sondern auch einen vom Durchflußzytometer und fluoreszenzmarkierten Substrat unabhängigen Vergleich der absoluten Rezeptorzahlen zwischen verschiedenen Labors.

Bei Verwendung von murinen fluoreszenzmarkierten Fab-Fragmenten von IgG-Antikörpern als kompetitives Substrat erfolgt die Inkubation einer sättigenden Konzentration dieser Antikörperfragmente mit einem Set von 5 Populationen von Plastekügelchen (Beads), die durch ihre unterschiedlichen Bindungskapazitäten für monoklonale Antikörper charakterisiert sind (z. B. Quantum Simply Cellular Microbead Kit® Sigma, Deisenhofen). Werden fluoreszenzmarkierte Substrate verwendet, die keine murinen monoklonalen Antikörper sind, muß die Kalibrierung bei bekanntem Fluoreszenzmolekül-Proteinmolekül-Verhältnis (F/P-Ratio) über ein Set von mehreren Plastekügelchen durchgeführt werden. Diese Beadpopulationen sind mit demselben Fluoreszenzfarbstoff wie das Substrat markiert und leuchten mit unterschiedlicher, definierter Fluoreszenzstärke (Quantum Fluorescence Kit for MESF units of FITC®, Sigma, Deisenhofen).

Gerätekalibrierung und Standardisierung

Bei quantitativen Messungen mit dem Durchflußzytometer muß mittels fluoreszenzmarkierter Plastekügelchen die Leistungsstärke des Lasers täglich kontrolliert werden. Hierfür wird das Fluoreszenzsignal dieser Beads unter denselben Geräteeinstellungen wie bei Thrombozytenmessungen analysiert. Durch Setzen eines Markers über der Beadpopulation wird deren mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt und durch Nachstellen der Verstärkerspannung konstant gehalten.

Bei Durchflußzytometern, die in der Online-Software die Möglichkeit eines Autosetup haben (z. B. Coulter EPICS®XL mit System 2-Software), wird diese zur automatischen Nachkorrektur aktiviert. Hierfür wird in dem Protokoll zur Messung der Beads ein sehr schmaler Marker über der mittleren Fluoreszenzintensität der Beads gesetzt. Liegt

die mittlere Fluoreszenzintensität der Beads bei Folgemessungen außerhalb dieses Markers, paßt die Software die Verstärkerspannung automatisch an und optimiert so bedienerunabhängig die Geräteeinstellung.

Die Erfindung wird an Beispielen erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

- Die nachfolgende Vorschrift wurde für die Quantifizierung der Fibrinogenrezeptorblockade durch das Medikament ReoPro® (murin-human chimerer Klon c7E3 Fab; abciximab) optimiert.

Ansatz

Als kompetitives fluoreszenzmarkiertes Substrat wurden FITC-markierte Fab-Fragmente des Klons c7E3 verwendet. Die FITC-Kopplung erfolgte mit einem kommerziellen Fluoreszenzmarkierungs-Kit (Sigma, Deisenhofen). Die Identifizierung der Thrombozyten im Vollblut erfolgt mit dem PE-Cy5-markierten Antikörperklon SZ21 (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg), der mit dem c7E3-Klon nicht um die Bindungsstelle am Fibrinogenrezeptor kompetitiert (13).

Das Vollblut des Patienten wird mit einem isoosmolaren Puffer (HBSS, pH 7,4, mit 1 mg/ml humanes Immunglobulin G) auf 10.000 Thrombozyten/µl verdünnt. 20 µl des verdünnten Vollblutes werden mit 5 µl des FITC-markierten Fab-Fragmentes c7E3 (Proteinkonzentration 0,3 mg/ml) zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz ohne Blockade des Fibrinogenrezeptors durch Reo-Pro® für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und dann für weitere 5 min bei RT mit 10 µl PE-Cy5-markiertem Antikörper SZ21 zur Thrombozytenidentifizierung inkubiert. Die maximale Stimulation erfolgt im parallelen Ansatz mit einer Aktivatorkonzentration von 500 µM iso-TRAP-6 für 30 min bei RT. Nach Auffüllen mit 2 ml Pufferlösung werden 10.000 Thrombozyten am Durchflußzytometer mit einer Flußrate von 500–1000 Partikeln pro Sekunde gemessen. Die Identifizierung der Thrombozyten erfolgt über ihre hohe Fluoreszenzintensität für PE-Cy5 und ihre Größe, die als Vorwärtstreulicht gemessen wird. Diese Population wird mit einer Region markiert und in einer nächsten Darstellung mit Vorwärts- gegen Seitstreulicht entsprechend den bekannten Streulichteigenschaften für Thrombozyten überprüft. Nach Setzen einer Region um die erneut als Thrombozyten verifizierte Population und Ausschluß von Zellfragmenten, Aggregaten, Erythrozyten und Leukozyten wird nun die mittlere Fluoreszenzintensität in einer dritten Darstellung für die FITC-Fluoreszenz ermittelt (entspricht 0% Blockade).

Parallel erfolgt ein Ansatz mit 20 µl verdünntem Vollblut und ReoPro® (Endkonzentration 5 µg/ml) für 10 min bei RT. Anschließend wird zunächst mit 5 µl markiertem c7E3-Fab-FITC für 10 min und schließlich mit 10 µl SZ21-PE-Cy5 für 5 min bei RT inkubiert. Nach Auffüllen mit 2 ml Puffer erfolgt die Messung.

Die so ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität für die FITC-Fluoreszenz entspricht dem Wert "100% Blockade".

Kalibrierung der Fluoreszenzsignale in die Anzahl geblockter Fibrinogenrezeptoren durch den therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten

Die Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzwerte wird mit dem Quantum Fluorescence Kit for MESF units of FITC® (Sigma, Deisenhofen) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Fünf verschiedene Beadpopulationen sind mit einer bekannten Anzahl von FITC-Molekülen gekoppelt. Dementsprechend kann einer bekannten Zahl

von FITC-Molekülen eine Fluoreszenzintensität zugeordnet werden. Die mit den fünf Beadpopulationen erstellte Eichgerade dient zur Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzintensität der Thrombozyten in die Anzahl gebundener FITC-Moleküle. Unter Verwendung der spektrophotometrisch bestimmten F/P-Ratio unserer c7E3-Fab-Fragmente (Lot 12/97: 4,2) kann aus der Anzahl gebundener FITC-Moleküle auf die am Thrombozyten gebundenen fluoreszenten Fab-Fragmente geschlossen werden. Vollblut und Beadsuspension werden unter identen Geräteeinstellungen gemessen.

Gerätekalibrierung und Standardisierung

Für die Standardisierung und Überwachung der Geräteeinstellung werden fluoreszente Beads (z. B. Flow-Set Fluorospheres®, Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg), in einem separaten Protokoll mit sehr schmalen Markern für ihr mittleres Vorwärtstreulichtsignal und die Fluoreszenzsignale bei 525 nm (FITC) sowie > 650 nm (PE-Cy5) analysiert. Die Nachkorrektur für Abweichungen von den gespeicherten Markereinstellungen im Meßprotokoll erfolgt automatisch unter Nutzung der Auto-Setup-Funktion der System 2-Software des Durchflußzytometers EPICS XL der Fa. Coulter.

Der Assay weist merkliche Vorteile gegenüber den bisher bekannten Methoden auf. Insbesondere ist er für klinisch und experimentell tätige Mediziner, Laborchemiker und Naturwissenschaftler angrenzender biologischer Gebiete interessant. Für die klinische Anwendung des ersten zugelassenen Fibrinogenrezeptorantagonisten (ReoPro®) existiert z.Zt. nur eine auf dem Körpergewicht basierende Dosisempfehlung für die Bolusgabe und anschließende zwölfstündige Infusion entsprechend dem Ergebnis einer multizentrischen Studie. Eine individuelle Dosisadaptierung, die durch das Erreichen einer vorgegebenen prozentualen Blockierung der Fibrinogenrezeptoren des Patienten gesteuert wird, würde die klinische Effektivität und Sicherheit des Medikamentes weiter verbessern. Der vorliegende Assay bietet die methodische Grundlage für die Datenerhebung und den Vergleich der Meßergebnisse zwischen verschiedenen Labors. Für die genannte Problemstellung ist bislang kein Assay verfügbar, der den komplexen Anforderungen gerecht wird.

Neben der Anwendung im klinischen Umfeld kann der Assay auch für die Testung der Wirkung neuer Fibrinogenrezeptorantagonisten in vitro und im Tiermodell genutzt werden. Die Kenntnisse über Dosis-Wirkungsbeziehungen bereits charakterisierter Rezeptorinhibitoren sind mit neuen Substanzen vergleichbar.

Literatur

1. Lefkovits, J., Ivanhoe, R.J., Califf, R.M., Bergelson, B.A., Anderson, K.M., Stoner, G.L., Weisman, H.F., Topol, E.J. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by a chimeric monoclonal antibody (abciximab) on acute and six-month outcomes after percutaneous transluminal coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 77 (1996) 1045–51
2. Tcheng, J.E., Impact of eptifibatide on early ischemic events in acute ischemic coronary syndromes: a review of the IMPACT II trial. Integrilin to Minimize Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis. *Am J Cardiol* 80 (1997) 21B–28B
3. Theroux, P., Kouz, S., Roy, L., Knudtson, M.L., Doitati, J.G., Marquis, J.F., Nasmith, J., Fung, A.Y., Boudreault, J.R., Delage, F., Dupuis, R., Kells, C.,

- Bokslag, M., Steiner, B., Rapold, H.J. Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina. The Canadian Lamifiban Study. *Circulation* 94 (1996) 899–905
4. Collier, B.S., Lang, D., Scudder, L.E. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 95 (1997) 860–67
5. Channing-Rodgers, R.P., Levin, J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Haemost* 16 (1990) 1–20
6. Mascelli, M.A., Lance, E., Mack, S., Weisman, H., Schaible, T., Jordan, R. Rapid assessment of platelet inhibition using a modified whole blood aggregometer (Aggrestat) in PTCA patients receiving ReoPro. *J Am Coll Cardiol* 27 (1996) 361
7. Greulich, P.E., Alving, B.M., O'Neill, K.L., Chang, A.S., Reid, T.J. Modified thromboelastography: a rapid, simple method for monitoring c7E3 Fab in heparinized patients. *Blood* 86 (1995) 545
8. Kundu, S., Heilmann, E., Sio, R., Garcia, C., Ostgaard, R. Characterization of the platelet function analyzer, PFA-100™. *Thromb Haemost* 73 (1995) 1061
9. Breddin, H.K., Brreddin, H., Kirchmaier, C.M., Keppler, S. Methods to monitor the effects of the glycoprotein IIb/IIIa inhibitors and their interaction with other antithrombotic agents. *Thromb Haemost* 73 (1995) 1446
10. Collier, B.S., Scudder, L.E., Beer, J., Gold, H.K., Folts, J.D., Cavagnaro, J., Jordan, R., Wagner, C., Iulucci, J., Knight, D., Ghrayed, J., Smith, C., Weisman, H., Berger, H. Monoclonal antibodies to platelet gpIIb/IIIa as antithrombotic agents. *Ann N Y Acad Sci* 614 (1991) 193–213
11. Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., Jordan, R.E. Analysis of gpIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88 (1996) 907–914
12. Anderson, D.R., Zayed, E., Embree, J., Theroux, P., Steiner, B. Flow cytometry as a quantitative measure of the antiplatelet activity of a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor. *Blood* 86 (1995) 893a
13. Besson, I., McGregor, M.C. Effect of antagonists on gpIIb/IIIa receptor occupancy: Use of a whole blood flow cytometry assay. *Thromb Haemost Suppl* (1997) 664
14. Faraday, N., Goldschmidt-Clermont, P., Dise, K., Bray, P.F. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry. *J Lab Clin Med* 123 (1994) 728–740
15. Collier, B.S., Springer, K.T., Scudder, L.E., Kutok, J.L., Cemso, M., Prestwich, G.D. Substituting isoserine for serine in the thrombin receptor activating peptide SFLLRN confers resistance to aminopeptidase M-induced cleavage and inactivation. *J Biol Chem* 268 (1993) 20741–20743

Patentansprüche

1. Assay für die Verwendung in der Durchflußzytometrie zur Analyse der Rezeptorblockade durch therapeutisch eingesetzte Fibrinogenrezeptorantagonisten, bestehend aus
- a) einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten wie monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere

und

- b) einem kompetitiven fluoreszenzmarkiertem Fibrinogenrezeptorantagonisten wie monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere.
2. Verfahren zur Bestimmung der Fibrinogenrezeptorblockade auf Thrombozyten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kompetition eines fluoreszenten Substrates mit einem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten um die Bindung am Fibrinogenrezeptor die quantitative und selektive Analyse der Fibrinogenrezeptorblockade dergestalt ermöglicht, daß
- a) als kompetitives fluoreszenzmarkiertes Substrat monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere verwendet werden, die in an sich bekannter Weise mit einem kommerziellen Fluoreszenzmarkierungskit mit einem in der Durchflußzytometrie üblichen Fluoreszenzfarbstoff wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), energy coupled dye (ECD), PerCP®, Phycoerythrin-Cyan 5 (PE-Cy5) oder Allophycocyanin (APC) markiert sind,
- b) als therapeutisch eingesetzter Fibrinogenrezeptorantagonist monoklonale Antikörper oder Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper oder lineare oder zyklische Peptide oder nicht-peptidische Reptorantagonisten oder Aptamere eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) dem Patienten Blut entnommen wird,
- b) das Vollblut auf eine Zahl von 10.000 Thrombozyten/µl eingestellt wird,
- c) ein Teil des verdünnten Vollblutes unstimuliert mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates inkubiert wird und nachfolgend der Fluoreszenzwert der unstimulierten Probe ermittelt wird,
- d) ein anderer Teil des verdünnten Vollblutes, der die gleiche Anzahl von Thrombozyten enthält, mit einem starken, proteaseresistenten Agonisten stimuliert wird und der Fluoreszenzwert nach anschließender Inkubation mit einer sättigenden Konzentration des fluoreszenzmarkierten Substrates gemessen wird,
- e) ein dritter Teil des verdünnten Vollblutes, der die gleiche Anzahl von Thrombozyten enthält, in vitro mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten versetzt wird,
- f) die Thrombozyten in den drei Volumina nach gleicher Methodik identifiziert werden,
- g) aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten die therapeutisch blockierten bzw. blockierbaren Fibrinogenrezeptoren rechnerisch bestimmt werden,
- h) nachdem die gemessene Fluoreszenzintensität der Thrombozyten in die Anzahl gebundener Fluoreszenzmoleküle umgerechnet wird, was nach Kalibrierung des Gerätes mit fünf verschiedenen fluoreszenten Beadpopulationen gelingt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Einstellen auf 10.000 Thrombozyten/µl durch Verdünnen mit Pufferlösung wie phoshatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder mit Hanks Balanced

Salts (HBSS) bei pH 7,4 mit einem Gehalt von 1 mg/ml humanem Immunglobulin G erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der maximale Fluoreszwert der unstimulierten Probe den Nullwert der Rezeptorblockade darstellt. 5

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Stimulierung der Thrombozyten mit einem proteaseresistenten starken Agonisten wie TRAP-6 mit N-terminaler Substitution von Serin durch Isoserin erfolgt. 10

7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der maximale Fluoreszwert der stimulierten Probe den Nullwert der Rezeptorblockade bei maximal stimulierten Thrombozyten darstellt.

8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogerezeptorantagonisten die Fibrinogerezeptoren blockiert werden. 15

9. Verfahren nach Anspruch 3 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß der therapeutisch eingesetzte Fibrinogerezeptorantagonist in einer solchen Menge zugesetzt wird, daß seine Endkonzentration dem Doppelten der zur Therapie zugelassenen Medikamentendosis entspricht. 20

10. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung der Thrombozyte dergestalt erfolgt, daß der jeweiligen verdünnten Vollblutprobe ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper in sättigender Konzentration zugesetzt wird, der eine räumlich weit von der Fibrinogenbindungsstelle entfernte Struktur des Fibrinogerezeptors erkennt und mit einem anderen Fluoreszfarbstoff als das kompetitive Substrat markiert ist. 25 30

11. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem therapeutisch eingesetzten Fibrinogerezeptorantagonisten die Fibrinogerezeptoren blockiert werden. 35

12. Verfahren nach Anspruch 3 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß der therapeutisch eingesetzte Fibrinogerezeptorantagonist in einer solchen Menge zugesetzt wird, daß seine Endkonzentration dem Doppelten der zur Therapie zugelassenen Medikamentendosis entspricht. 40

13. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung der Thrombozyte dergestalt erfolgt, daß der jeweiligen verdünnten Vollblutprobe ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper in sättigender Konzentration zugesetzt wird, der eine räumlich weit von der Fibrinogenbindungsstelle entfernte Struktur des Fibrinogerezeptors erkennt und mit einem anderen Fluoreszfarbstoff als das kompetitive Substrat markiert ist. 45 50

14. Verfahren nach Anspruch 3 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß als monoklonale Antikörper die Klone SZ21 oder gleichwertige andere eingesetzt werden. 55

15. Verfahren nach Anspruch 3 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Fluoreszenzfarbstoffe dergestalt ausgewählt werden, daß sie sich in ihren Emissionsbereichen nicht wesentlich überlappen. 60

16. Verfahren nach Anspruch 3, 10 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Fluoreszenzfarbstoffpaare FITC mit PE-Cy5 oder FITC mit PerCP oder PE mit PE-Cy5 oder PE mit PerCP verwendet werden. 65